



CU04/00006

REC'D 28 MAY 2004

WIPO

PCT

**REPÚBLICA DE CUBA**



**Ing. María de los Angeles Sánchez Torres, Directora de la OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.**

92 / 2003

**CERTIFICO:** Que bajo el número noventa y dos del año dos mil tres del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **ANTICUERPOS RECOMBINANTES Y FRAGMENTOS QUE RECONOCEN EL GANGLIÓSIDO N-GLICOLIL GM3 Y SU USO PARA DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES**, con fecha veintitrés de abril del dos mil tres, a las dos horas y treinta minutos pasado meridiano, por Olga Lidia Moreno Samper, Representante, ciudadano cubano, a nombre y en representación del CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR, cuya invención fue creada por Lourdes Tatiana Roque Navarro, Cristina María Mateo de Acosta del Río, Mabel Rodríguez González, Gertrudis Rojas Dorantes, Ariel Talavera Pérez, Ernesto Moreno Frías.

**ASIMISMO CERTIFICO:** Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

**TAMBIÉN CERTIFICO:** Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Josefa Lombardero, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los cinco días del mes de mayo del dos mil cuatro.

  
**Ing. María de los Angeles Sánchez Torres**  
Directora  
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial

## ANTICUERPOS RECOMBINANTES Y FRAGMENTOS QUE RECONOCEN EL GANGLIOSIDO N-GLICOLIL GM3 Y SU USO PARA DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES.

### 5 Sector técnico.

La presente invención se relaciona fundamentalmente con la Inmunología y en particular con la obtención de inmunoglobulinas menos inmunogénicas por la vía de la ingeniería genética para su uso en el tratamiento del cáncer. Más específicamente la presente invención se relaciona con las secuencias peptídicas que codifican un anticuerpo  
 10 monoclonal recombinante o fragmentos derivados del mismo que reconocen específicamente antígenos que contienen el gangliósido N-glicolil GM3 y no otros gangliósidos del tipo N-glicolil o N-acetil, ni a los glicolípidos sulfatados.

### Técnica anterior.

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico y que están  
 15 presentes en las membranas plasmáticas de vertebrados (Stults CLM y cols. Methods Enzymology 179:167-214, 1989). Algunas de estas moléculas han sido reportadas en la literatura como antígenos asociados a tumores o marcadores tumorales (Hakamori SH: Curr Opin Immunol 3:646-653, 1991), por lo que se ha descrito el uso de anticuerpos anti-gangliósidos como útiles en el diagnóstico y terapéutica del cáncer (Houghton AN y cols.  
 20 PNAS USA 82:1242-1246, 1985; Zhang S y cols. Int J Cancer 73:42-49, 1997). Los ácidos siálicos más comúnmente encontrados en células de animales son el N-acetil (NAc) y el N-glicolil (NGc) (Corfield AP y col, Cell Biol Monogr 10:5-50, 1982). En general el NGc no está expresado en tejidos normales de humanos y pollos, pero está ampliamente distribuido en otros vertebrados (Leeden RW y cols. Biological Role of Sialic  
 25 Acid. Rosenberg A and Shengtrund CL (Eds). Plenum Press, New York, 1-48, 1976, Kawai T y cols. Cancer Research 51:1242-1246, 2001). Sin embargo, reportes de la literatura muestran que anticuerpos anti-NGc reconocen algunos tumores humanos y líneas de células tumorales (Higashi H y cols. Jpn J. Cancer Res. 79:952-956, 1988, Fukui Y y cols. Biochem Biophys Res Commun 160:1149-1154, 1989). Se ha encontrado  
 30 además un incremento de los niveles del gangliósido GM3 (NGc) en cáncer de mama humano (Marquina G y cols. Cancer Research 56:5165-5171, 1996), lo que hace francamente atractivo el uso de esta molécula como blanco para la terapia del cáncer.

La solicitud de patente EP 0972782 A1 describe el anticuerpo monoclonal murino 14F7, producido por el hibridoma depositado según el tratado de Budapest bajo el número de  
 35 acceso ECACC 98101901. Este anticuerpo monoclonal tiene isotipo IgG1 y fue generado a partir de la inmunización de ratones Balb/c con el gangliósido NGcGM3 conjugado

hidrofóticamente con lipoproteínas de baja densidad (VLDL) y en presencia de adyuvante de Freund, dicho anticuerpo se une preferentemente al gangliósido NGcGM3, y reconoce un antígeno expresado en tumores humanos de mama y melanoma (Carr A y col, Hybridoma 19:3:241-247, 2000). Este anticuerpo mostró una fuerte actividad citolítica sobre células portadoras de dicha secuencia, propiedad que podría convertirlo en un arma terapéutica.

Por otra parte es conocido que la neovascularización inducida por los tumores constituye uno de los parámetros fundamentales en el control del crecimiento tumoral, lo cual ha dirigido las investigaciones hacia la búsqueda de nuevas armas terapéuticas relacionadas con la inhibición del proceso angiogénico. Existen evidencias experimentales del efecto del anticuerpo 14F7 sobre este proceso, dichas evidencias se han encontrado en ensayos con matrigel (Angiogenesis. Vol. 4, Pags. 113-121, 2001; Anti-Cancer Res. Vol.18, Pags.783-790, 1998). El matrigel es una mezcla de proteínas constituyentes de la membrana basal y de la matriz extracelular que rodea a las células endoteliales. Su utilidad en el estudio del proceso de neovascularización radica en la importancia fisiológica de las interacciones endotelio-matriz durante el desarrollo de una nueva vasculatura. Igualmente componentes de este gel, como la laminina, se consideran marcadores importantes en este proceso.

En el estudio de los mecanismos relacionados con la angiogénesis inducida por el tumor también ha sido muy utilizado este tipo de modelo, permitiendo evaluar fármacos capaces de modular los eventos relacionados directamente con el tumor para, de esta forma, influir en su crecimiento y metástasis.

El uso de anticuerpos monoclonales no-humanos, tales como el 14F7 murino, tiene ciertas desventajas para tratamiento de humanos, particularmente en un esquema terapéutico repetitivo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales murinos tienen un tiempo de vida media en sangre relativamente corto, además de que pierden importantes propiedades inmunológicas como son las funciones efectoras cuando son usados en humanos.

Y lo que podría resultar de mayor importancia, los anticuerpos monoclonales murinos contienen considerables secuencias de aminoácidos que resultan inmunogénicas cuando son inyectadas a humanos. Numerosos estudios han mostrado que, después de la administración de un anticuerpo extraño, la respuesta inmune producida en el paciente puede ser considerablemente fuerte y eliminar sustancialmente la utilidad terapéutica del anticuerpo después de un tratamiento inicial. Más aún, después de administrar tratamiento a un paciente con un anticuerpo monoclonal murino, tratamientos ulteriores con anticuerpos murinos no-relacionados podrían no ser efectivos e incluso peligrosos

5 debido a la reactividad cruzada conocida como respuesta HAMA (Khazaeli, M.B., y cols. *Journal of Immunotherapy* 15: 42-52, 1994).

Mateo y colaboradores. (Patente Americana No. US 5 712 120) describen un procedimiento para la reducción de la inmunogenicidad de los anticuerpos murinos. El anticuerpo modificado por el método descrito por Mateo y colaboradores (Mateo C y cols. 10 *Hybridoma* 19:6:463-471, 2000), retiene la capacidad de reconocimiento y unión al antígeno del anticuerpo original y resulta menos inmunogénico, lo cual incrementa su utilidad terapéutica. Mediante este procedimiento se logra, con un pequeño número de mutaciones, obtener anticuerpos modificados que muestran una reducción de la inmunogenicidad al ser comparados con el anticuerpo quimérico.

15 De lo antes expuesto se infiere la necesidad de obtención de versiones de los anticuerpos terapéuticos, que sean menos inmunogénicos en humanos, que se obtengan de forma sencilla y económica y que resulten adecuados para la fabricación de formulaciones terapéuticas u otros usos.

También es conocido que el uso de fragmentos de anticuerpos ha sido muy útil en el 20 inmuno-diagnóstico de enfermedades. Ira Pastan entre otros (Solicitud de Patente Europea EP 0796334 A1) describe la construcción de fragmentos de tipo Fv de cadena sencilla usando las regiones variables de anticuerpos que reconocen específicamente el carbohidrato relacionado con el antígeno Lewis Y. Basándose en dichos fragmentos, desarrolla un método para detectar células portadoras de dicho antígeno, también aporta 25 evidencias del efecto inhibitor que estos fragmentos ejercen sobre células portadoras del antígeno.

El conocimiento del sitio de unión del anticuerpo monoclonal 14F7 resulta interesante desde el punto de vista práctico y teórico, por el potencial de dicho anticuerpo en la inmunoterapia de diversas enfermedades. Souriau, C y cols. en *Expert Opin. Biol. Ther.* 30 1, 845-855, 2001 y Chester, K. A., y cols. en *Dis. Markers*. 16, 53-62, 2000, muestran que el uso de fragmentos de anticuerpos del tipo scFv podría resultar de gran utilidad terapéutica aprovechando sus propiedades farmacológicas tales como una mejor penetración en el tejido tumoral.

La construcción de mini-bibliotecas de fragmentos de anticuerpo expuestos sobre fagos 35 filamentosos a partir de hibridomas, permite la selección de moléculas con capacidad de reconocimiento específico del antígeno dentro de este repertorio. El objetivo es la

obtención rápida de fragmentos de anticuerpos que combinan el reconocimiento del anticuerpo original con un menor tamaño molecular y la capacidad de ser producidos por un hospedero bacteriano. Esta técnica permite descartar las múltiples variantes de fragmentos de anticuerpo no funcionales o imposibles de producir en bacterias que se obtienen durante el aislamiento y la manipulación de los genes de las regiones variables de un hibridoma por técnicas convencionales de clonación (Roovers, R. C. Y cols. Br. J. Cancer. 78, 1407-1416, 1998).

La tecnología de presentación de fragmentos de anticuerpo en fagos filamentosos ofrece una oportunidad única para acceder al sitio de unión de un anticuerpo, así como para introducir modificaciones en el mismo con el objetivo de mejorar afinidad (Chames, P. y cols. J. Immunol. 161, 5421-5429, 1998, Lamminmaki, U y cols. J. Mol. Biol. 291, 589-602, 1999, Parhami-Seren y cols. J. Immunol. Methods. 259, 43-53, 2002) o modular su especificidad (Iba, Y. y cols. Prot. Engn., 11, 361-370, 1998, Miyazaki, C. y cols. Prot. Engn. 12, 407-415, 1999, Darveau, R. P. y cols. J. Clin. Immunoassay. 15, 25-29, 1992).

La expresión de fragmentos de anticuerpos en fagos filamentosos permite el intercambio de cadenas (Lantto, J. y cols. Methods Mol. Biol. 178, 303-316, 2002), es decir la combinación de diferentes VLs, con la VH original del anticuerpo o viceversa lo cual hace posible estudiar el papel que juega cada una de las cadenas en el reconocimiento del antígeno y su influencia en la afinidad del anticuerpo (Kabat, E. A., Wu, T. T., J. Immunol. 147, 1709-1719, 1991, Barbas III, C. F., Lerner, R. A. Methods: A companion to Methods in Enzymology 2, 119-124, 1991). El intercambio de cadenas permite modificar las propiedades del sitio de unión y también combinar secuencias de inmunoglobulinas provenientes de diferentes especies, y seleccionar aquellas variantes que conserven la especificidad de reconocimiento. (Klimka, A. Y cols. Br. J. Cancer. 83, 252-260, 2000, Steinberger, P. y cols., J. Biol. Chem. 275, 36073-36078, 2000, Rader, C. y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 8910-8915, 1998, Beiboer, S. W. H. y cols. J. Mol. Biol. 296, 833-849, 2000).

La presente invención se refiere a un anticuerpo modificado derivado del anticuerpo murino 14F7, el cual reconoce el antígeno original con igual afinidad y resulta menos inmunogénico cuando es administrado a pacientes. Otro hallazgo de la presente invención ha sido la obtención de fragmentos derivados de dicho anticuerpo que comprenden regiones variables de cadena ligera diferentes de la original, pero retienen sus propiedades en lo que concierne a especificidad, afinidad, y reconocimiento, y pueden ser expresados por un hospedero bacteriano tanto en forma de moléculas solubles como presentadas en la superficie de fagos filamentosos. Los fragmentos derivados del anticuerpo 14F7 son útiles como armas terapéuticas. Adicionalmente la

expresión de fragmentos del tipo scFv del anticuerpo 14F7 sobre la superficie del un fago filamentoso M13 permite manipular su sitio de unión y obtener variantes de mayor afinidad con fines terapéuticos. Es otro objetivo de la presente invención la caracterización de fragmentos del anticuerpo que solo conservan parcialmente la secuencia del 14F7, pero retiene sus propiedades en lo que concierne a especificidad, afinidad, y reconocimiento.

Tanto el anticuerpo modificado como los fragmentos obtenidos, reconocen específicamente células tumorales que expresan el antígeno NGcGM3, lo cual permite que pueda ser usado en el diagnóstico o terapia de dichos tumores y tienen como ventaja sobre el anticuerpo murino del cual se originaron, que resultan menos inmunogénicos.

Son objetos de la presente invención nuevas composiciones farmacéuticas las cuales comprenden el anticuerpo modificado 14F7 o sus fragmentos Fv de cadena sencilla, donde dicho anticuerpo o fragmento puede estar enlazado a un isótopo radiactivo útil en la localización o tratamiento de tumores que expresen el antígeno.

Es también objeto de la presente invención un método para el radioinmunodiagnóstico o radioinmunoterapia de tumores que expresen el gangliósido NGcGM3, donde sean utilizadas las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo modificado 14F7 ó sus fragmentos unidos a un isótopo radioactivo.

#### **Descripción detallada de la invención.**

En la presente invención se describe un anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo monoclonal murino 14F7 producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 98101901, caracterizado porque las secuencias de las regiones hipervariables (CDRs) de las cadenas pesada y ligera son:

#### **CADENA PESADA**

CDR1: SYWIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY

#### **CADENA LIGERA**

CDR1: RASQSI>NNLH

CDR2: YASQSI

CDR3: QQSNRWPLT

Preferiblemente dicho anticuerpo quimérico está caracterizado porque las secuencias de las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y ligera son:

#### **CADENA PESADA**

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT

FR2: WLKQRPDQGLEWIG

FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

FR4: WGQGTTVTVSS

5 CADENA LIGERA

FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC

FR2: WYQQRTHESPRLLIK

FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFC

FR4: FGAGTKLELKRA

- 10 Y más preferible aún, el anticuerpo quimérico está caracterizado porque contiene la región constante de cadena pesada IgG1 humana y la región constante de cadena ligera Ck humana.

En una representación preferible, la presente invención se refiere a un anticuerpo modificado derivado del anticuerpo monoclonal murino 14F7 producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 98101901, caracterizado porque las regiones de los marcos de las cadenas pesada y ligera contienen cualquiera de las siguientes mutaciones:

CADENA PESADA:

Posición 5: Q por V

20 Posición 9: N por A

Posición 11: L por V

Posición 12: A por R

Posición 18: M por V

Posición 19: K por R

25 Posición 20: M por V

Posición 38: K por R

Posición 40: R por A

Posición 42: D por G

Posición 48: I por V

30 CADENA LIGERA:

Posición 39: R por K

Posición 40: T por P

Posición 41: H por G

Posición 42: E por Q

35 Posición 58: I por V

Preferiblemente, dicho anticuerpo modificado está caracterizado porque contiene la región constante de cadena pesada IgG1 humana y la región constante de cadena ligera Ck humana.

5 En otro aspecto de la presente invención se refiere a fragmentos del tipo Fv de cadena sencilla derivados del anticuerpo 14F7 que comprenden la secuencia de la región variable de la cadena pesada obtenida a partir del hibridoma (depósito ECACC 98101901), y conservan la especificidad de reconocimiento del 14F7.

10 Preferiblemente, dichos fragmentos Fv incluyen regiones variables de cadena ligera provenientes de ratones o humanos no inmunizados, diferentes de la región variable de cadena ligera producida por el citado hibridoma, que permiten su producción por un hospedero bacteriano en forma de fragmentos de anticuerpo presentados sobre fagos filamentosos o moléculas solubles.

15 La presente invención también se relaciona con las líneas celulares que expresan los anticuerpos quimérico y humanizado, y los clones bacterianos que producen los fragmentos derivados del 14F7.

Además, la presente invención se relaciona con las composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o localización e identificación de tumores malignos de mama, melanomas, sus metástasis y recidivas, caracterizadas porque contienen uno de los anticuerpos monoclonales recombinantes o sus fragmentos descritos en la presente invención, así  
20 como un excipiente apropiado para su aplicación. Dicho anticuerpo o fragmento podría estar unido a un isótopo radioactivo, útil en la localización y/o terapia de los tumores malignos.

Por ultimo la presente invención se relaciona con el uso de los anticuerpos recombinantes descritos, para su uso en la fabricación de una composición farmacéutica  
25 útil en el tratamiento y/o localización e identificación de tumores malignos

La descripción detallada de como llevar a cabo y utilizar la presente invención se realiza a continuación:

**1. Síntesis de ADNc y amplificación por la RCP (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de las regiones variables del anticuerpo murino 14F7.**

30 El anticuerpo murino 14F7 fue obtenido por inmunización de ratones Balb/c con el gangliósido GM3 (NeuGc) conjugado hidrofóticamente con lipoproteínas de baja densidad y en presencia del adyuvante de Freund (EP 0972782 A1, Carr A y cols. Hybridoma 19:3:241-247, 2000). El ARN se obtiene de  $10^6$  células del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal 14F7 (AcM murino, IgG1, que reconoce al  
35 gangliósido NGcGM3, utilizando el método de extracción del TRIZOL (GIBCO BRL, NY), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.



La síntesis del ADN complementario (ADNc) y la amplificación de las regiones variables VH y VL se realizan utilizando el juego de reactivos Access RT-PCR (Promega, USA) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, la reacción se realiza a partir de 5 µg de ARN en presencia de 25 pmoles del oligonucleótido dT diseñado para hibridar en la cola polyA del ARN, y de los oligonucleótidos correspondientes a los extremos de cada región variable, VH y VK. Se incuban 10 min a 60°C y posteriormente se le añade una mezcla que contiene 0.2 mM de cada deoxinucleótido (dNTPs), 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 u de AMV-Transcriptasa Reversa y 5 u de ADN Polimerasa en buffer de reacción, para un volumen total de 50 µL. Se incuban las muestras 45 min a 48°C, 2 min a 94°C, y posteriormente son sometidas a 40 ciclos de RCP con temperaturas de 94°C (30 seg), 60°C (1 min), 68°C (2 min), con una incubación final de 7 min a 68°C.

## 2. Construcción de genes quiméricos y secuenciación del ADNc amplificado.

Los productos de las RCP de VH y VK son digeridos con las enzimas de restricción *Eco* RV- *Nhe* I, para VH, y *Eco* RV-*Sal* I para VK, y clonadas en los respectivos vectores de expresión (Coloma MJ y cols. J Immunol Methods 152:89-104, 1992). La región VH es clonada en el vector PAH4604 que tiene incluida una región constante IgG1 humana y como marcador de selección el gen de resistencia al L-histidinol. La región VK es clonada en el vector PAG4622, el cual porta un gen de resistencia al ácido micofenólico y una región constante kappa humana. Las construcciones genéticas resultantes se nombran 14F7VH-PAH4604 y 14F7VK-PAG4622, respectivamente.

Ambas construcciones son secuenciadas por el método de los dideoxinucleótidos (Sanger F y cols. PNAS USA 74:5463-5470, 1979) usando el juego de reactivos de secuencia T7 ADN Polimerasa (Amersham-Pharmacia) de acuerdo al protocolo descrito por los fabricantes.

## 3. Expresión del anticuerpo quimérico.

Células NS0 son electroporadas con 10 µg de 14F7VH-PAH4604 y 10 µg de 14F7VK-PAG4622 linealizados con la enzima *Pvu* I. Los ADNs se precipitan con etanol, se mezclan y disuelven en 50 µL de SSTF (solución salina tamponada de fosfato). Aproximadamente 10<sup>7</sup> células se crecen hasta semiconfluencia y se colectan por centrifugación, posteriormente se resuspenden en 0.5 mL de SSTF junto con el ADN en una cubeta de electroporación. Después de 10 min en hielo las células son sometidas a un pulso de 200 V y 960 F, y se mantienen en hielo por 10 min. Las células se cultivan en placas de 96 pozos en medio selectivo, Dulbecco Modificado (DMEM-F12) con 10% de suero fetal de ternera (SFT) y 10 mM de L-histidinol. Los clones transfectados se hacen visibles a los 10 días de añadido el medio de selección.

La producción de inmunoglobulina quimérica se determina por ELISA partiendo del sobrenadante de los clones. Para ello se recubren placas de poliestireno (High binding, Costar) con suero de chivo anti-IgG humano (Sigma) en tampón carbonato bicarbonato 100 mM, pH 9.8, toda la noche a 4°C. Las mismas se lavan con SSTF-t (solución salina tamponada de fosfato, 0.5% Tween-20, pH 7.5), y se añaden las muestras de sobrenadante de cultivo diluidas en SSTF-t-SFT durante una hora a 37°C. Las placas se lavan nuevamente con SSTF-t y se incuban con un suero de chivo anti-cadena kappa humana conjugado a peroxidasa (Jackson), una hora a 37°C. Posteriormente se lavan las placas de igual forma y se incuban con una solución tampón citrato-fosfato pH 4.2 que contiene el sustrato o-fenilendiamina. Después de 15 min la absorbancia es medida a 492 nm.

La capacidad de reconocimiento del antígeno por el anticuerpo quimérico es verificada por un ELISA competitivo usando los gangliósidos NGcGM3 y NAcGM3. Brevemente, se recubren placas de poliestireno (Polysorp, Nunc) con 50 µL de una solución a 4 µg/mL de NGcGM3 o NAcGM3 en metanol y se incuban durante una hora a 37°C. Las mismas se bloquean con 200 µL de una solución de seroalbúmina bovina (SAB) 1% en tampón Tris-HCl, pH 7.8-8.0 durante una hora a 37°C. Luego de tres lavados con SSTF, se añaden las muestras diluidas en Tris-HCl-SAB 1% en un rango de concentración entre 2 µg/mL - 0.01 µg/mL en presencia del anticuerpo 14f7 murino biotinilado 1 mg/mL, a 37°C durante 2h. Posteriormente se lava con SSTF y se desarrolla la reacción con un conjugado estreptavidina-peroxidasa (Jackson), a 37°C, 1h. La absorbancia se mide a 492 nm.

#### **4. Construcción del Ac humanizado 14F7hT por humanización de epítomos T. Predicción de epítomos T.**

Las secuencias de los dominios variables del 14F7 son analizadas con el Programa AMPHI (Margalit H y cols. J Immunol 138: 2213-2229, 1987), el cual permite la identificación de segmentos de 7 u 11 aminoácidos con una estructura de hélice anfipática, la cual se ha relacionado con la inmunogenicidad T. Estos algoritmos predicen en este caso fragmentos relacionados con la presentación de epítomos T en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal murino 14F7.

#### **- Análisis de homología con inmunoglobulinas humanas.**

Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables del 14F7 son comparadas con las secuencias de regiones variables de inmunoglobulinas humanas reportadas, para identificar la inmunoglobulina humana que posea mayor homología con la molécula murina sometida a análisis. Para ello se puede utilizar la base de datos SWISSPROT disponible en Internet, a través del programa BLAST (Altschul S F y cols. Nucleic Acids Res 25:3389-3402, 1997).

### - Análisis para la reducción de inmunogenicidad.

La esencia del método radica en lograr una reducción de la inmunogenicidad por la ruptura o humanización de los posibles epitopes T, con un mínimo de mutaciones en los FRs, específicamente en aquellos segmentos que tienen una estructura de hélice anfipática, quedando excluidas aquellas posiciones involucradas con la estructura tridimensional del sitio de reconocimiento del antígeno.

Según el método, se comparan las secuencias de las regiones variables de VH y VL de la inmunoglobulina murina con la humana más homóloga y se identifican los residuos que difieren entre la secuencia murina y la secuencia humana, sólo en los segmentos anfipáticos que quedan dentro de la región de los FRs (Kabat E, Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition, National Institute of Health, 1991). Estos residuos "murinos" serán los susceptibles de ser mutados por aquellos que se encuentran en la misma posición en la secuencia humana.

Los residuos que se encuentran en las posiciones de los FRs responsables de las estructuras canónicas, aquellos presentes en la zona de Vernier, o los que participan en la interacción de la interfase VH-VL, no pueden ser mutados, porque pudieran afectar la estructura tridimensional del dominio variable del anticuerpo y por tanto afectar su unión al antígeno. Información adicional sobre la influencia de las sustituciones propuestas sobre la estructura terciaria, pueden ser obtenidas por modelaje molecular de las regiones variables.

Dado que en el análisis de las mutaciones pueden tenerse en cuenta elementos tales como la presencia de residuos prolina en la hélice anfipática o el hecho de que un determinado residuo murino no aparezca en la misma posición en la secuencia humana más homóloga pero sea frecuente en otras inmunoglobulinas humanas, es posible obtener una versión que contenga un máximo de mutaciones, es decir, donde se muten todos los residuos murinos que difieren de la secuencia humana, pero pueden obtenerse otras versiones con diferentes combinaciones de mutaciones.

Después de identificar sobre la secuencia murina del 14F7 los posibles epitopos T y de identificar dentro de estos segmentos los residuos diferentes a los humanos, las sustituciones se hacen por las técnicas convencionales de mutagénesis dirigida.

### - Clonaje y expresión del anticuerpo humanizado 14F7hT en células NSO.

Una vez obtenidas las construcciones genéticas correspondientes a las regiones VH y VL del anticuerpo 14F7hT, por el método descrito anteriormente, estas son clonadas en los respectivos vectores de expresión, de manera similar a la descrita anteriormente en el caso de la construcción del Ac quimérico, obteniéndose las construcciones genéticas siguientes: 14F7hTVK-PAG4622 y 14F7hTVH-PAH4604. La transfección de estos genes

a las células NS0 es exactamente bajo las mismas condiciones descritas para el anticuerpo quimérico. Los clones productores del anticuerpo humanizado son detectados igualmente por ELISA.

La capacidad de reconocimiento específico del antígeno por el anticuerpo humanizado es verificada por un ELISA competitivo usando los gangliósidos NGcGM3 y NAcGM3. El procedimiento es idéntico al descrito para el anticuerpo quimérico.

#### **5. Construcción de bibliotecas de fragmentos de anticuerpo sobre fagos filamentosos a partir del hibridoma 14F7.**

Se aísla el ARN mensajero a partir de las células del hibridoma 14F7, se sintetiza el ADN complementario y se amplifican por separado las secuencias correspondientes a las regiones variables de cadena pesada y ligera, utilizando dos juegos de oligonucleótidos diseñados para hibridar con una amplia gama de regiones variables murinas. Las regiones variables de cadena pesada amplificadas se purifican, se digieren con las enzimas apropiadas y se ligan al vector fagomidio pHG-1m (diseñado para la presentación de anticuerpos de cadena sencilla sobre la superficie de fagos filamentosos), previamente digerido con las mismas enzimas. Los productos de la reacción de ligamiento se purifican y se introducen por electroporación en bacterias de la cepa TG1 de *E.coli*. Las bacterias transformadas conforman una semi-biblioteca de regiones variables de cadena pesada de diversidad limitada (provenientes todas del hibridoma 14F7). Se purifica el ADN correspondiente a esta semi-biblioteca y se liga por separado a colecciones de regiones variables de cadena ligera (previamente purificadas y digeridas con las enzimas apropiadas). Finalmente se introducen las construcciones genéticas en bacterias de la cepa TG1 por electroporación, para conformar distintos tipos de bibliotecas independientes. Uno de ellos es una mini-biblioteca de diversidad limitada construida con las regiones variables de cadena ligera obtenidas también de las células del hibridoma 14F7. También se obtienen bibliotecas de intercambio de cadenas, donde las regiones variables de cadena pesada provenientes del hibridoma se combinan con colecciones diversas de regiones variables de cadena ligera obtenidas a partir de linfocitos murinos y humanos.

#### **6. Aislamiento y caracterización de clones productores de fragmentos de anticuerpo contra el N-glicolil GM3.**

Se toman al azar colonias de cada biblioteca para producir fagos a partir de ellas utilizando el fago auxiliador M13 K07. Se analiza directamente el reconocimiento del N-glicolil GM3 por los fagos portadores de fragmentos de anticuerpo a través de un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA). Se localizan así clones productores de fragmentos funcionales. Para obtener una preparación rica en fragmentos funcionales de

anticuerpo y explorar la diversidad de las bibliotecas, se producen fagos portadores de fragmentos de anticuerpo a partir de la mezcla total de bacterias transformadas que forma cada biblioteca. La mezcla de fagos obtenida se pone en contacto con el antígeno N-glicolil GM3 unido a una superficie sólida, los fagos portadores de fragmentos de anticuerpo con capacidad de unión se retienen y el resto se elimina mediante lavados exhaustivos. Los fagos unidos se eluyen por un cambio de pH y se multiplican para obtener una nueva mezcla de fagos que sirva de material de partida para un nuevo ciclo de selección sobre el antígeno. Después de varios ciclos de selección, se analiza el reconocimiento de los fragmentos de anticuerpo presentados sobre fagos a partir de colonias. De este modo se identifican clones adicionales productores de fragmentos funcionales, que se encontraban diluidos en las bibliotecas iniciales.

La caracterización de los fragmentos de anticuerpo producidos por los clones incluye el análisis de su especificidad por ELISA frente a un panel de gangliósidos relacionados, el estudio del reconocimiento tumoral por inmunohistoquímica, la evaluación de su capacidad para ser producidos como fragmentos de anticuerpo solubles funcionales, fuera del contexto de su presentación en fagos, y la secuenciación completa de sus regiones variables.

#### **Ejemplos de Realización.**

En los siguientes ejemplos todas las enzimas de restricción o modificación utilizadas, así como reactivos y materiales fueron obtenidos de fuentes comerciales a menos que se especifique lo contrario.

#### **Ejemplo 1. Obtención del Anticuerpo Monoclonal Quimérico 14F7.**

La síntesis del ADNc y la amplificación por la RCP de las regiones variables murinas VH y VK se realizó con la enzima *Vent* Polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción *Eco* RV-*Nhe* I para VH, y *Eco* RV-*Sal* I para VK. Los oligonucleótidos usados como cebadores fueron los siguientes:

##### Para VH:

Oligonucleótido 1 (hibrida en el péptido señal):

5' ggg gatatc cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

Oligonucleótido 2 (hibrida en JH1):

5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

##### Para VK:

Oligonucleótido 1 (hibrida en el péptido señal):

5' ggg gatatc cacc atg gt(at) t(tc)c (ta)cá cct cag (at)t(ac) ctt gga ctt 3'

Oligonucleótido 2 (hibrida en VLJ5):

5' agc gtcgac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cc 3'

Los productos de las RCPs de VH y VK fueron digeridos con las enzimas de restricción *Eco RV-Nhe I*, para VH, y *Eco RV-Sal I* para VK, y clonados en sus respectivos vectores de expresión, PAH4604 y PAG4622, para VH y VK respectivamente. Estos vectores son usados para la expresión de inmunoglobulinas en células superiores y fueron donados por Sherie Morrison (UCLA, California, USA). El vector PAH4604 tiene incluida la región constante humana IgG1, y el PAG4622, una región constante kappa humana. (Coloma J y cols. J Immunol Methods 152:89-104, 1992). Una vez clonadas las regiones VH y VK del 14F7 en los vectores anteriores, se formaron las construcciones 14F7VH-PAH4604 y 14F7VK-PAG4622.

Doce clones independientes fueron secuenciados por el método de los dideoxinucleótidos (Sanger F et al, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS USA 1979;74:5463-5470) usando el kit de secuencia T7 ADN Polimerasa (Amersham-Pharmacia) de acuerdo al protocolo descrito por los fabricantes. Las secuencias de VH y VK tienen alta relación con el subgrupo IIB y V, respectivamente, (Figuras 1 A y B) según la clasificación de Kabat (Kabat E, Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition, National Institute of Health, 1991).

Células NS0 fueron electroporadas con 10 µg de 14F7VH-PAH4604 y 10 µg de 14F7VK-PAG4622 linealizados con la enzima *Pvu I*. Los ADNs fueron precipitados con etanol, mezclados y disueltos en 50 µL de SSTF. Aproximadamente  $10^7$  células crecidas hasta semiconfluencia, fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en 0.5 mL de SSTF junto con el ADN en una cubeta de electroporación. Después de 10 min en hielo las células fueron sometidas a un pulso de 200 V y 960 F e incubadas en hielo por 10 min. Las células se cultivaron en placas de 96 pozos en medio selectivo, Dulbecco Modificado (DMEM-F12) con 10% de SFT y 10 mM de L-histidinol. Los clones transfectados se hacen visibles a los 10 días de añadido el medio de selección.

La producción de inmunoglobulina quimérica se determina por ELISA partiendo del sobrenadante de los clones. Para ello se recubren placas de poliestireno (High binding, Costar) con suero de chivo anti-IgG humano (Sigma) en tampón carbonato bicarbonato 100 mM, pH 9.8, toda la noche a 4°C. Las mismas se lavan con SSTF-t (solución salina tamponada de fosfato, 0.5% Tween-20, pH 7.5), y se añaden las muestras de sobrenadante de cultivo diluidas en SSTF-t-SFT durante una hora a 37°C. Las placas se lavan nuevamente con SSTF-t y se incuban con un suero de chivo anti-cadena kappa humana conjugado a peroxidasa (Jackson), una hora a 37°C. Posteriormente se lavan las placas de igual forma y se incuban con una solución tampón citrato-fosfato pH 4.2 que contiene el sustrato o-fenilendiamina. Después de 15 min la absorbancia es medida a 492 nm.

### **Ejemplo 2. Reactividad del anticuerpo 14F7Q frente a los gangliósidos NGcGM3 y NAcGM3.**

Se determinó la reactividad del anticuerpo (Ac) quimérico del 14F7 por medio de un ELISA competitivo. En la Figura 2 se muestra la especificidad del 14F7 quimérico comparado con el 14F7 murino, en el reconocimiento de placas de poliestireno (Polysorp, Nunc) recubiertas con el gangliósido GM3 N-glicolilado. Ambos Acs muestran a concentraciones similares un 50% de inhibición del reconocimiento del Ac 14F7 murino biotinilado al antígeno. Mientras que no se observó inmunoreactividad al recubrir las placas con la variante N-acetilada del GM3 para ninguno de los anticuerpos. Se usó como Ac irrelevante el AcM murino ior-C5.

### **Ejemplo 3. Obtención de diferentes versiones del anticuerpo humanizado.**

Las secuencias de VH y VK del 14F7 fueron comparadas con una base de datos de secuencias humanas, obteniéndose la secuencia humana de mayor homología con el anticuerpo 14F7, para la región VH y VK (Fig 1A y B). En ambas secuencias se determinaron además las regiones anfipáticas o potenciales epitopos T. Posteriormente se determinaron las mutaciones necesarias para convertir las secuencias de VH y VK murinas en humanizadas, siguiendo este método de humanización de epitopos T. Señalamos a continuación el máximo de mutaciones posibles que pueden realizarse.

En el caso de la región VH se introdujeron mutaciones en las posiciones 5, 9, 11, 12, 18, 19, 20, 38, 40, 42 y 48, donde se sustituyeron los aminoácidos Q, N, L, A, M, K, M, K, R, D y I, por V, A, V, V, V, R, V, R, A, G y V, respectivamente. Estas mutaciones se realizaron por solapamientos de los productos de la RCP (Kamman M y cols. Nucleic Acids Research 17:5404-5410, 1989), usando los oligonucleótidos 1 y 2, y los 3 y 4, en las primeras RCPs, y el resultado de las mismas se solapó en otra RCP usando solo los oligonucleótidos 2 y 4. Las secuencias de los oligonucleótidos usados se muestran a continuación:

Oligonucleótidos para las mutaciones 5, 9, 11 y 12, de la cadena pesada:

Oligonucleótido 1: 5' gtc cag ctt gtg cag tct ggg gct gaa gtg gta aaa cct ggg 3'

Oligonucleótido 2: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

Oligonucleótido 3: 5' ccc agg ttt tac cac ttc agc ccc aga ctg cac aag ctg gac 3'

Oligonucleótido 4: 5' ggg gatatc cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

Una vez secuenciadas y verificadas las anteriores mutaciones, a los ADNs que portaban las mismas se les introdujo en las posiciones 18, 19 y 20 otras mutaciones, sustituyendo los aminoácidos M, K, M por V, R, V, respectivamente.

A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2, y los 3 y 4, descritos para dichas mutaciones. El solapamiento de los productos de las RCPs se hizo de la misma manera descrita anteriormente.

Oligonucleótidos para las mutaciones 18, 19 y 20 de la cadena pesada:

- 5 Oligonucleótido 1: 5' ggg gcc tca gtg agg gtg tcc tgc agg 3'  
 Oligonucleótido 2: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'  
 Oligonucleótido 3: 5' cct gca gga cac cct cac tga ggc ccc 3'  
 Oligonucleótido 4: 5' ggg gatatac cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

- De igual manera, una vez secuenciadas y verificadas las anteriores mutaciones, a los  
 10 ADNs que portaban las mismas se les introdujo en las posiciones 38, 40 y 42 las mutaciones R, A y G, que sustituyen los aminoácidos K, R y D, respectivamente.

A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2, y los 3 y 4, descritos para estas mutaciones. El solapamiento de los productos de las RCP se hizo de la misma manera descrita anteriormente.

- 15 Oligonucleótidos para las mutaciones 38, 40 y 42 de la cadena pesada:

Oligonucleótido 1: 5' cac tgg tta aga cag gca cct ggc cag ggt ctg 3'  
 Oligonucleótido 2: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'  
 Oligonucleótido 3: 5' cag acc ctg gcc agg tgc ctg tct taa cca gtg 3'  
 Oligonucleótido 4: 5' ggg gatatac cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

- 20 Por último, luego de verificar por secuencia las mutaciones anteriores, a los ADNs que portaban las mismas se les introdujo una mutación en la posición 48, sustituyendo el aminoácido I por V. A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2, y los 3 y 4, utilizados en esta mutación. El solapamiento de los productos de las RCPs se hizo de la misma manera descrita anteriormente.

- 25 Oligonucleótidos para la mutación 48 de la cadena pesada:

Oligonucleótido 1: 5' ctg gaa tgg gtt gga tac att 3'  
 Oligonucleótido 2: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'  
 Oligonucleótido 3: 5' aat gta tcc aac cca ttc cag 3'  
 Oligonucleótido 4: 5' ggg gatatac cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

- 30 Todas estas mutaciones fueron verificadas por secuencia. La construcción genética obtenida se denominó 14F7hTVH.

En el caso de la cadena pesada hay aminoácidos diferentes entre la cadena VH14F7 y la humana más parecida que no se realizaron porque estas sustituciones involucrarían aminoácidos de la zona de Vernier o son posiciones claves en el reconocimiento del

- 35 antígeno.



Para la cadena ligera, se realizaron mutaciones en las posiciones 39, 40, 41, 42 y 58, sustituyendo R, T, H, E, I, por K, P, G, Q, y V respectivamente. Las mutaciones fueron introducidas de la misma manera que en la cadena pesada; a continuación se describen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

- 5 Oligonucleótidos para las mutaciones 39, 40, 41, y 42 de la cadena ligera.

Oligonucleótido 1: 5' tat caa caa aaa cca ggt cag tct cca agg 3'

Oligonucleótido 2: 5' agc gtcgac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cc 3'

Oligonucleótido 3: 5' cct tgg aga ctg acc tgg ttt ttg ttg ata 3'

Oligonucleótido 4: 5' ggg gatatc cacc atg gt(at) t(tc)c (ta)ca cct cag (at)t(ac) ctt gga ctt 3'

- 10 Luego de verificar por secuencia las mutaciones anteriores, se procedió a introducir una mutación en la posición 58 a los ADNs que portaban las mismas, sustituyendo el aminoácido I por V. A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2, y los 3 y 4, que se utilizaron para dicha mutación. El solapamiento de los productos de las RCPs se realizó de la misma manera descrita anteriormente.

- 15 Oligonucleótidos para la mutación 58 de la cadena ligera:

Oligonucleótido 1: 5' att tct ggg gtc ccc tcc agg 3'

Oligonucleótido 2: 5' agc gtcgac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cc 3'

Oligonucleótido 3: 5' cct gga ggg gac ccc aga aat 3'

Oligonucleótido 4: 5' ggg gatatc cacc atg gt(at) t(tc)c (ta)ca cct cag (at)t(ac) ctt gga ctt 3'

- 20 Una vez realizada esta mutación, la misma fue verificada por secuencia.

La construcción genética resultante se denominó 14F7hTVK.

- 25 Las regiones VK y VH humanizadas fueron clonadas en los vectores PAG4622 y PAH4604, formando las construcciones 14F7hTVH-PAH4604 y 14F7hTVK-PAG4622, respectivamente. Células NS0 fueron electroporadas con 10 µg de cada uno de los vectores que portaban las regiones variables humanizadas, 14F7hTVH-PAH4604 y 14F7hTVK-PAG4622, previamente linealizados por digestión con *Pvu* I. El proceso de electroporación y detección de los clones que expresaban el anticuerpo humanizado 14F7hT fue idéntico al descrito para el anticuerpo quimérico.

- 30 **Ejemplo 4: Efecto del Ac 14F7 sobre la disminución del crecimiento tumoral en un modelo de inducción de angiogénesis tumoral *in vivo*.**

Como modelo de angiogénesis *in vivo* se usó la línea tumoral (melanoma B16) mezclada con matrigel como inductor de la angiogénesis.

- 35 Con la implantación subcutánea de la línea tumoral (B16) con matrigel en la línea media ventral de ratones machos C57/BL6, se midió la inducción del proceso de angiogénesis tumoral. Brevemente: Se mezclan células de melanoma B16 con 0.5 mL de matrigel y 64 unidades/mL de heparina, solos, en el grupo control, o en combinación con los

anticuerpos, para ser administrados por inyección subcutánea en la región abdominal de los animales. A los 15 días de la inoculación, los animales se sacrifican y se les extraen las perlas de geles junto con residuos de dermis y epidermis y se examina macroscópicamente el tamaño del tumor. Como se observa en la Figura 3, los tumores de los ratones tratados con el 14F7, disminuyen drásticamente el tamaño de la masa tumoral.

Para distinguir los neovasos se realiza un análisis histopatológico de los geles con tinción hematoxilina/eosina, y con inmunotinción con un AcM anti PECAM (marcador endotelial). En la Figura 4, A y B, se observa una disminución del número de vasos sanguíneos en los cortes de tejidos de los animales tratados con el 14F7, al compararlos con los cortes obtenidos de tumores de animales sin tratamiento.

**Ejemplo 5: Construcción de bibliotecas de fragmentos de anticuerpo sobre fagos filamentosos a partir del hibridoma 14F7.**

Se aisló el ARN mensajero con el reactivo TriPure Isolation Reagent (Boehringer Mannheim, Alemania) a partir de  $5.0 \times 10^6$  células del hibridoma 14F7 y se sintetizó el ADN complementario con el juego de reactivos Pro-STAR First Strand RT-PCR kit (Stratagene, EEUU). Las regiones variables de cadena pesada y ligera provenientes del hibridoma se amplificaron mediante 26 ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa, en las siguientes condiciones: 50 segundos a  $94^\circ\text{C}$ , 1 minuto a  $55^\circ\text{C}$ , 1 minuto a  $72^\circ\text{C}$ . Para ello se utilizaron todas las posibles combinaciones de un juego de oligonucleótidos degenerados (diseñados para hibridar con una amplia variedad de regiones variables de ratón), que se muestran en la tabla siguiente:

Oligonucleótidos usados para amplificar VH y VL. Las posiciones degeneradas aparecen entre paréntesis en la secuencia de los oligonucleótidos. Las secuencias de los sitios de restricción aparecen subrayadas.

5' VH Apa I

5'... ttc tat tct cac agt gca cag (gc)ag gt(gt) cag ct(gt) ac(ag) cag tc(at) gga 3'

5'... ttc tat tct cac agt gca cag gc(ag) gt(ct) ca(ag) ctg cag cag ct(ct) ggg gc 3'

5'... ttc tat tct cac agt gca cag ga(ag) gtg aag ct(gt) (gc)t(gc) gag tct gg(ag) gga 3'

3' VH Sfi I

5'... ga acc agt act cca ggc ctg agg ggc cgc aga gac agt gac cag agt ccc 3'

5'... ga acc agt act cca ggc ctg agg ggc cga gga gac ggt gac tga ggt tcc 3'

5'... ga acc agt act cca ggc ctg agg ggc cga gga gac (gt)gt ga(gc) (ca) gt gga (gc)cc...3'

5' VL Sal I

5'...gta ctc cag tcg acg aca ttg tg(ca) tg(at) t(ac)c agt ctc c... 3'

5'... gta ctc cag tcg acg ata tcc aga tga c(ac)c a(ga)a ct(ac) c... 3'

5'... gta ctc cag tcg ac(cg) aaa ttg t(tg)c tca ccc agt ctc c... 3'

3' V<sub>L</sub> Not I

5'...aag gaa aaa agc ggc cgc tt (tc)a(tg) (tc)tc cag ctt ggt... 3'

5'...aag gaa aaa agc ggc cgc tt (tg)a(tg) ctc caa ctt gt(gt)... 3'

- 5 Las regiones variables de cadena pesada amplificadas se purificaron y se digirieron secuencialmente con las enzimas de restricción Sfi I y ApaLI. Se purificaron los productos de la digestión y se ligaron con el ADN del vector fagomidio pHG-1m (Heber Biotec S.A., Cuba) (Figura 5). Con las construcciones genéticas resultantes se transformaron por electroporación bacterias de la cepa TG1 de *E.coli*. El conjunto de bacterias
- 10 transformadas conformó una semi-biblioteca de regiones variables de cadena pesada provenientes del hibridoma 14F7, con una talla moderada de  $2.3 \times 10^4$  miembros. Se purificó el ADN plasmídico de la semi-biblioteca y se digirió secuencialmente con las enzimas Not I y Sal I. Se ligó este ADN por separado con cuatro colecciones de regiones variables de cadena ligera, previamente digeridas con las mismas enzimas. Se
- 15 transformaron bacterias de la cepa TG1 con estas nuevas construcciones genéticas y se obtuvieron cuatro bibliotecas independientes. Una de ellas era una una mini-biblioteca de diversidad limitada que contenía las regiones variables, tanto de cadena pesada como ligera, provenientes del hibridoma 14F7, con un tamaño de  $1.6 \times 10^6$  individuos. Las otras tres eran bibliotecas de intercambio de cadenas que incorporaban colecciones diversas
- 20 de regiones variables de cadena ligera obtenidas previamente a partir de ratones (isotipo kappa) y humanos (isotipos kappa y lambda) y sus tallas fueron  $1.0 \times 10^7$ ,  $1.4 \times 10^6$ , y  $1.2 \times 10^6$  miembros respectivamente.

**Ejemplo 6. Aislamiento de clones productores de fragmentos de anticuerpo contra el N-glicolil GM3.**

- 25 Se produjeron fagos portadores de fragmentos de anticuerpo a partir de 92 clones tomados al azar de cada biblioteca, en pocillos de placas de microtitulación, según procedimientos ya descritos (Marks, J. D. y cols. J. Mol. Biol. 222,581-597. 1991). Se evaluó su especificidad en un ELISA sobre placas de cloruro de polivinilo (Costar, EEUU) recubiertas con N-glicolil GM3 y N-acetil GM3 a  $1\mu\text{g/ml}$ . Se detectaron los fagos unidos
- 30 con un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado a peroxidasa de rábano picante (Amersham, Suecia). Además de la caracterización individual de clones tomados al azar se procedió a la selección de fagos con capacidad de unión al N-glicolil GM3 a partir de la mezcla de fagos producida por el conjunto de bacterias que conformaban cada biblioteca. Para ello, se produjeron fagos utilizando el fago auxiliador M13 K07, se purificaron por
- 35 precipitación con polietilenglicol según el procedimiento citado y se pusieron en contacto con el N-glicolil GM3 unido a una superficie plástica (Inmunotubos, Nunc, Dinamarca). Se

- lavarón extensivamente los tubos y se eluyeron los fagos en presencia de trietilamina 100 mmol/l. El eluato se neutralizó y se utilizó para infectar bacterias de la cepa TG1 de *E.coli*. A partir del conjunto las bacterias infectadas se produjeron y se purificaron nuevamente fagos portadores de fragmentos de anticuerpo, que se utilizaron como
- 5 material de partida para una nueva ronda de selección en condiciones idénticas a las descritas. Después de cuatro ciclos de selección se tomaron al azar 92 colonias de bacterias infectadas con los fagos resultantes de cada biblioteca y se analizó el reconocimiento del N-glicolil GM3 de forma similar a la descrita para la evaluación de los clones tomados al azar de las bibliotecas.
- 10 A partir del análisis directo de los clones de las bibliotecas se aislaron clones productores de fagos portadores de fragmentos de anticuerpo que reconocían al N-glicolil GM3, que se encontraban en una frecuencia variable en las tres bibliotecas de intercambio de cadenas. No se encontró ningún clon positivo en la mini-biblioteca formada exclusivamente por las regiones variables provenientes del hibridoma 14f7. Después de
- 15 los ciclos de selección se aislaron clones adicionales a partir de las bibliotecas de intercambio de cadenas, y no se encontró ninguno en la mini-biblioteca de secuencias originales. La siguiente tabla muestra las cantidades de clones productores de fragmentos de anticuerpo que reconocen al N-glicolil GM3 y la frecuencia que representan del total de clones analizados, a partir de cada biblioteca. Solo un clon
- 20 produjo fagos que presentaban reactividad cruzada con el N-acetil GM3.

Biblioteca	Frecuencia de clones positivos (tamizaje directo)	Frecuencia de clones positivos (cuatro ciclos de selección)
Mini-biblioteca hibridoma 14F7	0/92	0/92
Intercambio de cadenas ligeras kappa murinas	31/92 (33.70%) *	52/92 (56.52%)
Intercambio de cadenas ligeras kappa humanas	2/92 (2.17%)	8/92 (17.39%)
Intercambio de cadenas ligeras lambda humanas	4/92 (4.35%)	12/92 (13.04%)

1 clon con reactividad cruzada con el N-acetil GM3.

### Ejemplo 7. Caracterización de los fragmentos de anticuerpo derivados del 14F7 que reconocen al N-glicolil GM3

Se secuenciaron totalmente las regiones variables de 11 fragmentos de anticuerpo con un secuenciador automático ALF Express II (Pharmacia, Suecia), utilizando oligonucleótidos que hibridan en las regiones del vector pHG-1m que flanquean los extremos 5' y 3' de las secuencias que codifican para los fragmentos de anticuerpo insertados. Se confirmó que la secuencia de la región variable de cadena pesada de todos corresponde a la reportada para el 14F7, solo se presentan cambios en las regiones marco 1 y marco 4, presumiblemente introducidos por el uso de oligonucleótidos degenerados en la RCP. El resto de las secuencias, incluidos los tres CDRs no tenían variaciones. Por el contrario, las secuencias de las regiones variables de cadena ligera de los 11 clones fueron todas diferentes a la del 14F7 y se agruparon en 5 grupos de secuencias diferentes entre sí, dos de origen murino, uno de origen humano (isotipo kappa) y otros dos de origen humano, pero de isotipo lambda. Se tomó un clon representativo de cada grupo de secuencias para su caracterización posterior.

La tabla siguiente muestra las diferencias entre las regiones variables de cadena ligera de los clones seleccionados, en cuanto a su identidad con la original, su origen e isotipo y la clasificación es subgrupos según la clasificación de Kabat.

	Origen de VL	Isotipo	Identidad con VL 14F7	Subgrupo
AcM 14F7	Murino	kappa	-	V
ScFv 2Am	Murino	kappa	59.46%	III
ScFv 3Fm	Murino	kappa	59.81%	V
ScFv 7Bhk	Humano	kappa	60.74%	I
ScFv 7Ahl	Humano	lambda	35.45%	I
ScFv 8Bhl	Humano	lambda	37.04%	III

Las diferencias entre las regiones variables de cadena ligera de los clones y la reportada originalmente para el anticuerpo 14F7 se localizan a lo largo de toda la secuencia, incluyendo las tres regiones determinantes de la complementareidad, y se muestran a continuación (Figura 6).

#### Fr1

14F7 Mab    D L V L T Q S P A T L S V T P G D S V S F S C  
 2Am scFv    . I . M F . . . . S . A . S L . Q R A T I . .  
 3Fm scFv    . I Q M . . T . S S . . A S L . . R . T I . .

7Bhk scFv . I Q M . . T . S S . . A S V . . R . T I T .  
 7Ahl scFv Q S V V . . P . S A . G G . . Q . L T I . .  
 8B hl scFv S S E L . . D . . V . . A L . Q T . R I T .

## CDR1

R A S Q . . . . . S I S N N L H  
 . . . . . S V S S . S Y S Y M .  
 . . . . . D . . . Y . N  
 . . . . . . . . S F . N  
 T G T S S D V G G Y . H V S  
 Q G D S L R . Y Y A S

## Fr2

W Y Q Q R T H E S P R L L I K  
 . . . . . K P G Q P . K . . . .  
 . . . . . K P D G T V K . . . . V  
 . . . . . K P G K A . K . . . . Y  
 . . . . . H P G K A . K . M . Y  
 . . . . . K P G Q A . V . V . Y

5

## CDR2

Y A S Q S I S  
 . . . N L E .  
 . T . R L H .  
 A . . N L Q .  
 D V . K R P .  
 G K N N R P .

## Fr3

G I P S R F S G S G S G T D F T L S I I A V E T E D F G M Y F C  
 . V . A . . . . . . . . . . N . H P . . E . . A A T . Y .  
 . V . . . . . . . . . . Y S . T . S N L . Q . . I A T . . .  
 . V . . . . . R . . . . . T . S S L Q P . . . A A . Y .  
 . V . H . . . . . K . . N T A S . T V S G L Q A . . E A V . Y .  
 . . . D . . . . . S . . N T A S . T . T G A Q A . . E A D . Y .

10

## CDR3

Q Q S N R W P . . . L T F  
 . H . R D V . . . .  
 . . G . T L . . . P . .  
 . . G Y T T . . . .  
 S S Y A G S N N . V .  
 N S R D S S G N H V V .

## Fr4

G A G T K L E L K  
 . . . . . I .  
 . . . . . . .  
 . Q . . . . .  
 . G . . . V T V L  
 . G . . . T V L

La especificidad de la unión se confirmó por ELISA, según el procedimiento descrito, pero utilizando como recubrimiento, además del N-glicolil GM3 y el N-acetil GM3, un panel de gangliósidos relacionados que incluía varios gangliósidos N-acetilados y uno N-glicolilado. La Figura 7 muestra el reconocimiento de los distintos antígenos por los cinco clones productores de fragmentos de anticuerpo caracterizados. Solo se detectó la unión al antígeno blanco N-glicolil GM3. El resto de los antígenos no fueron reconocidos.

La producción de fragmentos de anticuerpo solubles (fuera del contexto de los fagos) por los clones se indujo en presencia de isopropil-tiogalactopiranosido a 1mmol/l. Se colectaron los sobrenadantes y se obtuvieron las fracciones periplasmáticas según procedimientos ya establecidos (de Haard, H. J. Biol. Chem. 274, 18218-18230, 1999.) Se detectó actividad de reconocimiento del N-glicolil GM3 tanto en los sobrenadantes de cultivo como en las fracciones periplasmáticas, a través de un ELISA sobre placas recubiertas con dicho antígeno similar al descrito, pero con el siguiente cambio. Los fragmentos de anticuerpo unidos se detectaron utilizando el anticuerpo monoclonal 9E10 (dirigido contra el péptido *c-myc* que está fusionado en la construcción genética a los fragmentos de anticuerpo), a 10 µg/ml y un conjugado anti-inmunoglobulinas de ratón (Sigma, EEUU). Se purificaron los fragmentos de anticuerpo a partir de las fracciones periplasmáticas en un paso único de cromatografía de afinidad a iones metálicos utilizando la matriz HIS-Select HC Nickel Affinity Gel (Sigma, EEUU) según las instrucciones del fabricante. La figura 8 muestra la actividad determinada por ELISA de los fragmentos solubles purificados.

#### **Breve Descripción de las Figuras.**

**Figura 1:** En la figura se muestra la secuencia aminoacídica de las regiones variables VH (a) y VK (b) del AcM 14F7, y la secuencia humana respectiva más homóloga. Los CDRs se encuentran subrayados, y las regiones anfipáticas, potenciales epitopos T, aparecen sombreados. Se muestra además la secuencia resultante de la humanización de las regiones variables con las mutaciones realizadas.

**Figura 2:** Reconocimiento del anticuerpo 14F7Q medido por un ELISA competitivo.

Eje X: Expresa la concentración de los anticuerpos.

Eje Y: Absorbancia medida a 492 nm

El anticuerpo monoclonal ior C5 se uso como control negativo.

**Figura 3:** Efecto del anticuerpo monoclonal 14F7 sobre el crecimiento de tumores murinos (línea tumoral melanoma B16).

**Figura 4:** A) Estudio Inmunohistoquímico de del efecto del Anticuerpo Monoclonal 14F7 sobre la formación de vasos sanguíneos. Las flechas indican los vasos inmunomarcados. B) Inhibición de la Angiogénesis inducida por el Anticuerpo Monoclonal 14F7.

**Figura 5:** Diagrama del vector pHG-1m.

- 5 **Figura 6:** Secuencia de proteínas de las regiones VL del anticuerpo monoclonal 14F7 y de los fragmentos Fv de cadena sencilla seleccionados. Los puntos significan homología con la secuencia de las VL del 14F7.

- 10 **Figura 7:** Especificidad del reconocimiento por los fagos portadores de fragmentos del anticuerpo. Se observa la inhibición de la unión del Ac 14F7 al ganglósido por los fragmentos expuestos en los fagos. Las placas se recubrieron con N-glicolil GM3 y los fagos fueron incubados con partículas virales y varias concentraciones de 14F7.

**Figura 8.** Reconocimiento del N-glicolil Gm3 por los fragmentos solubles purificados.

15

20

---

Olga L. Moreno Samper  
Agente Oficial  
LEX, S. A.



# **ANTICUERPOS RECOMBINANTES Y FRAGMENTOS QUE RECONOCEN EL GANGLIOSIDO N-GLICOLIL GM3 Y SU USO PARA DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES.**

5

## **REIVINDICACIONES**

1.- Un anticuerpo recombinante derivado del anticuerpo monoclonal murino 14F7 producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 98101901, caracterizado porque las secuencias de las regiones hipervariables (CDRs) de las cadenas pesada y

10 ligera son las que se muestran a continuación:

CADENA PESADA

CDR1: SYWIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY

15 CADENA LIGERA

CDR1: RASQSSISNNLH

CDR2: YASQSSIS

CDR3: QQSNRWPLT

2.- El anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque es una variante quimérica del anticuerpo 14F7 el cual contiene los CDRs y las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y ligera de dicho anticuerpo 14F7 y la región constante de

20 cadena pesada IgG1 humana y la región constante de cadena ligera Ck humana, siendo las secuencias de las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y ligera las siguientes:

25 CADENA PESADA .

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT

FR2: WLKQRPDQGLEWIG

FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

FR4: WGQGTTVTVSS

30 CADENA LIGERA

FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC

FR2: WYQQRTHESPRLLIK

FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLISVETEDFGMYFC

FR4: FGAGTKLELKRA

35 3.- Un anticuerpo según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado porque es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal 14F7 el cual contiene mutaciones puntuales las

regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y ligera para reducir su inmunogenicidad.

4.- Un anticuerpo según la reivindicación 3 caracterizado porque es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal 14F7 cuyas regiones de los marcos de las cadenas pesada y ligera contienen cualesquiera de las siguientes mutaciones:

CADENA PESADA:

Posición 5: Q por V

Posición 9: N por A

Posición 11: L por V

10 Posición 12: A por R

Posición 18: M por V

Posición 19: K por R

Posición 20: M por V

Posición 40: R por A

15 Posición 42: D por G

CADENA LIGERA:

Posición 39: R por K

Posición 40: T por P

Posición 41: H por G

20 Posición 42: E por Q

6. Fragmento Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo monoclonal murino 14F7 producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 98101901, caracterizado porque contiene la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal murino 14F7 y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo murino.

25 7. Fragmento Fv de cadena sencilla según la reivindicación 6, caracterizado porque la región variable de la cadena ligera es del propio anticuerpo 14F7.

8. Fragmento Fv de cadena sencilla según las reivindicaciones 6 y 7 caracterizado porque las secuencias de las regiones hipervariables (CDRs) de las cadenas pesada y ligera son las que se muestran a continuación:

30 CADENA PESADA

CDR1: SYWIIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY

CADENA LIGERA

35 CDR1: RASQSIENNHLH

CDR2: YASQSI

CDR3: QQSNRWPLT

9.- Fragmento Fv de cadena sencilla según la reivindicación 8 caracterizado porque contiene los CDRs y las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y ligera de dicho anticuerpo 14F7, siendo las secuencias de las regiones de los marcos (FRs) de las

5 cadenas pesada y ligera las siguientes:

CADENA PESADA

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT

FR2: WLKQRPDQGLEWIG

FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

10 FR4: WGQGTTVTVSS

CADENA LIGERA

FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC

FR2: WYQQRTHESPRLLIK

FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFC

15 FR4: FGAGTKLELKRA

10.- Fragmento Fv de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 9 el cual contiene mutaciones puntuales las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y ligera para reducir su inmunogenicidad.

11.- Fragmento Fv de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 10 cuyas regiones de los marcos de las cadenas pesada y ligera contienen cualesquiera de las siguientes mutaciones:

CADENA PESADA:

Posición 5: Q por V

Posición 9: N por A

25 Posición 11: L por V

Posición 12: A por R

Posición 18: M por V

Posición 19: K por R

Posición 20: M por V

30 Posición 40: R por A

Posición 42: D por G

CADENA LIGERA:

Posición 39: R por K

Posición 40: T por P

35 Posición 41: H por G

Posición 42: E por Q

12.- Fragmento Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo monoclonal murino 14F7 producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 98101901 según la reivindicación 6, caracterizado porque contiene la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal murino 14F7 y una región variable de cadena ligera cuya secuencia es la siguiente:

Fr1

D I V M F Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C

CDR1

R A S Q S V S S S S Y S Y M H

Fr2

W Y Q Q K P G Q P P K L L I K

CDR2

Y A S N L E S

Fr3

G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E E D A A T Y Y C

CDR3

Q H S R D V P L T F

Fr4

G A G T K L E I K

13.- Fragmento Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo monoclonal murino 14F7 producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 98101901 según la reivindicación 6, caracterizado porque contiene la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal murino 14F7 y una región variable de cadena ligera cuya secuencia es la siguiente:

Fr1

D I Q M T Q T P S S L S A S L G D R V T I S C

CDR1

R A S Q D I S N Y L N

Fr2

W Y Q Q K P D G T V K L L I V

CDR2

Y T S R L H S

Fr 3

G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D I A T Y F C

CDR 3

Q Q G N T L P P T F

5

Fr 4

G A G T K L E L K

14.- Fragmento Fv de cadena sencilla derivado del anticuerpo monoclonal murino 14F7 producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 98101901, caracterizado porque contiene la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal murino 14F7 y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo humano.

15.- Fragmento Fv de cadena sencilla según la reivindicación 14, caracterizado porque contiene la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal murino 14F7 y una región variable de cadena ligera cuya secuencia es la siguiente:

Fr1

D I Q M T Q T P S S L S A S V G D R V T I T C

CDR 1

R A S Q S I S S F L N

20

Fr 2

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y

CDR 2

A A S N L Q S

Fr 3

G V P S R F S G R G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A A Y Y C

25

CDR 3

Q Q G Y T T P L T F

Fr 4

G Q G T K L E L K

30

16.- Fragmento Fv de cadena sencilla según la reivindicación 14, caracterizado porque contiene la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal murino 14F7 y una región variable de cadena ligera cuya secuencia es la siguiente:

Fr1

Q S V V T Q P P S A S G G P G Q S L T I S C

5

CDR1

T G T S S D V G G Y N H V S

Fr2

W Y Q Q H P G K A P K L M I Y

10

CDR2

D V S K R P S

Fr3

G V P H R F S G S K S G N T A S L T V S G L Q A E D E A V Y Y C

CDR3

S S Y A G S N N L V F

15

Fr4

G G G T K V T V L

17.- Fragmento Fv de cadena sencilla según la reivindicación 14, caracterizado porque contiene la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal murino 14F7 y una región variable de cadena ligera cuya secuencia es la siguiente:

20

Fr1

S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C

CDR1

Q G D S L R S Y Y A S

25

Fr2

W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y

CDR2

G K N N R P S

30

Fr3

G I P D R F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C

**CDR 3****N S R D S S G N H V V F****Fr 4****G G G T K L T V L**

5

18.- Una línea celular caracterizada porque expresa el anticuerpo recombinante o el fragmento Fv de cadena sencilla de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 17.

19.- Composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos caracterizada porque comprende el anticuerpo recombinante o el fragmento Fv de cadena sencilla de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 17, y un excipiente apropiado.

20.- Composición farmacéutica según la reivindicación 19 caracterizada porque es útil para el tratamiento de tumores malignos de mama, melanomas, sus metástasis y recidivas.

21.- Reactivo para la localización e identificación "in vivo" de tumores malignos caracterizada porque comprende el anticuerpo recombinante o el fragmento Fv de cadena sencilla de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 17 y un marcador apropiado.

22.- Un reactivo según la reivindicación 21 caracterizado porque es utilizado para la localización e identificación "in vivo" de tumores malignos de mama, melanomas, sus metástasis y recidivas.

25 Olga L. Moreno Samper  
Agente Oficial  
LEX, S. A.

**ANTICUERPOS RECOMBINANTES Y FRAGMENTOS QUE RECONOCEN EL  
GANGLIOSIDO N-GLICOLIL GM3 Y SU USO PARA DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO  
DE TUMORES.**

5

**RESUMEN**

La presente invención se relaciona fundamentalmente con la producción de  
inmunoglobulinas menos inmunogénicas por la vía de la ingeniería genética, y mas  
específicamente con un anticuerpo monoclonal que reconoce antígenos que contienen el  
10 gangliósido N-glicolil GM3 y no otros gangliósidos del tipo N-glicolil o N-acetil, ni a los  
glicolípidos sulfatados. Mas específicamente la presente invención se relaciona con las  
secuencias peptídicas que codifican un anticuerpo monoclonal recombinante contra el  
ganliósido n-glicolil GM3, o fragmentos derivados del mismo y composiciones  
farmacéuticas conteniendo dicho anticuerpo o sus fragmentos y su uso tanto diagnostico  
15 o terapéutico en cáncer de mama y melanoma.

20

Olga L. Moreno Samper  
Agente Oficial  
LEX, S. A.

25

30

35



FIGURA 1:

5 A)

	10	20	30	40	50	60
VH 14f7	QVQLQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFTSYWIHWLKORPDQGLEWIGYIDPATAYTESNQKF					
VH humana	.T..V...A.VR.....VRV..K....T.IDSY...IR.A.GH....V.W.N.NSGG.NYAPR.					
VH 14f7hT	....Q....A.VV.....VRV.....R.A.G.....V.....					

10

	70	80	90	100	110
VH 14f7	KDKAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARESP---RLRRGIYYIYAMDYWGQGTFTVTVSS				
VH humana	QGRVTM.R.A.FS..Y.D.R..R.D....F...KSD.FWSDYYNFD.S.TL.V.....				
VH 14f7hT	.....				

15

B)

	10	20	30	40	50	60
VK 14f7	DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSCRASQISNNLHWYQORTHESEPRLLIKYASQISISGIPSRFSG					
VK humana	.IQM.Z..SS..ASV.BR.TIT....ZT..SY.B..ZZKPGKA.B...YA..BLH..V.....					
VK 14f7hT	.....RTHE.....V.....					

20

	70	80	90	100
VK 14f7	SGSGTDFTLISIISVETEDFGMYFCQSNRWPLTFGAGTKLELKRA			
VK humana	.....B..FT.S.LZPZB,AT.Y.ZZ.Y.S.T...Z..R.ZI...			
VK 14f7hT	.....			

25

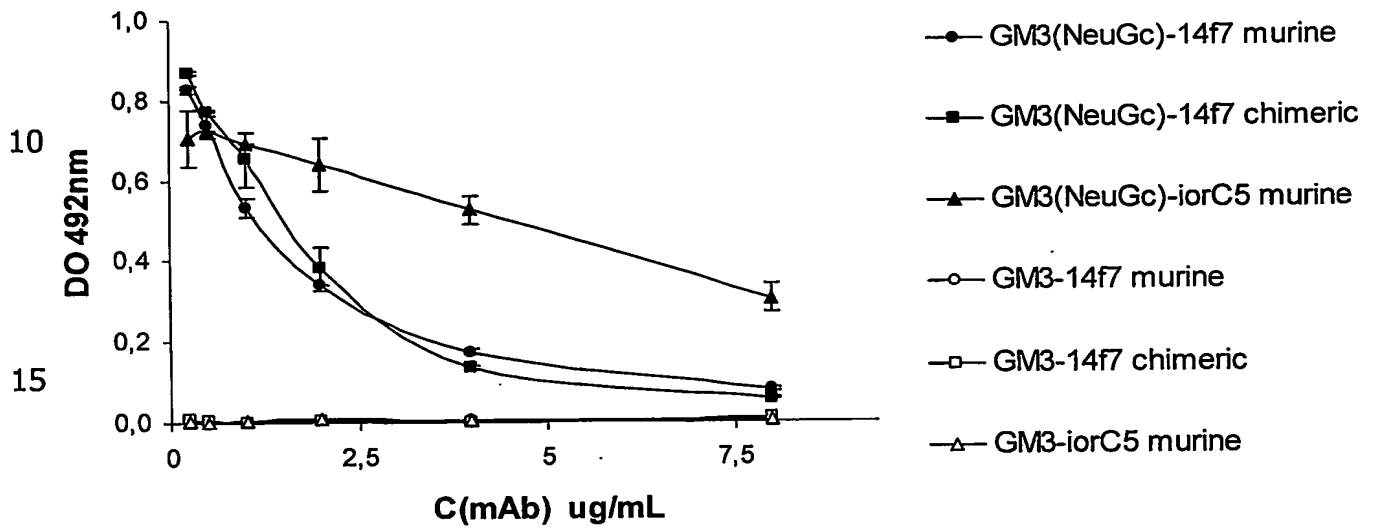
30

35

40

FIGURA 2:

5



20

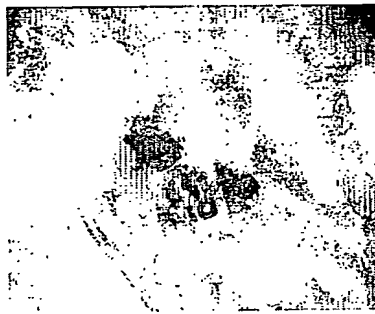
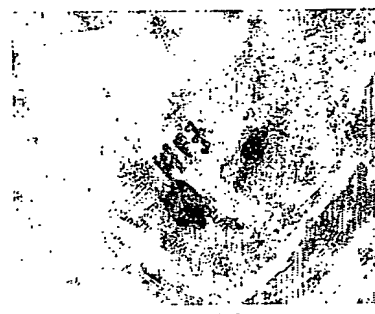
25

30

35

FIGURA 3:

5

**B16F****B16F1 +****B16F1+14**

10

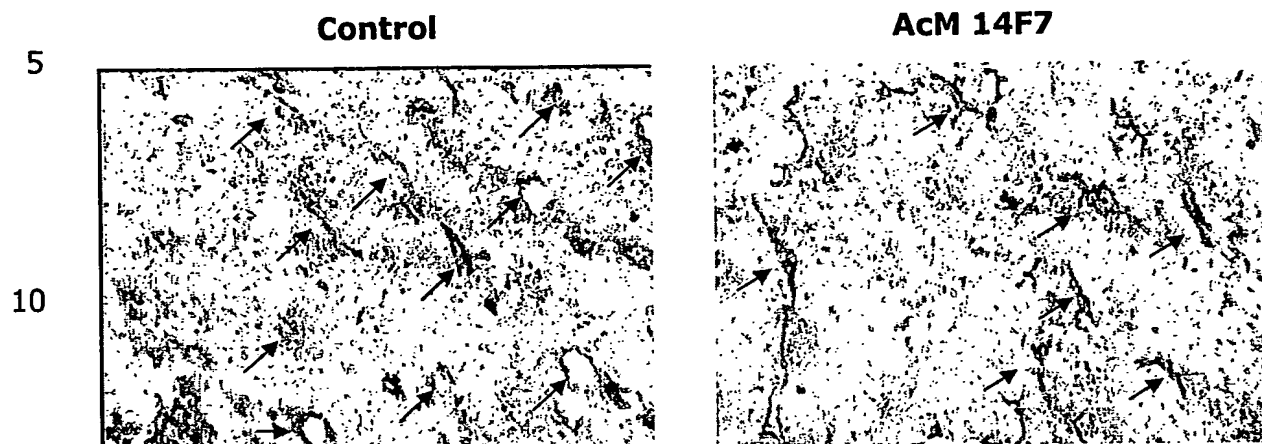
15

20

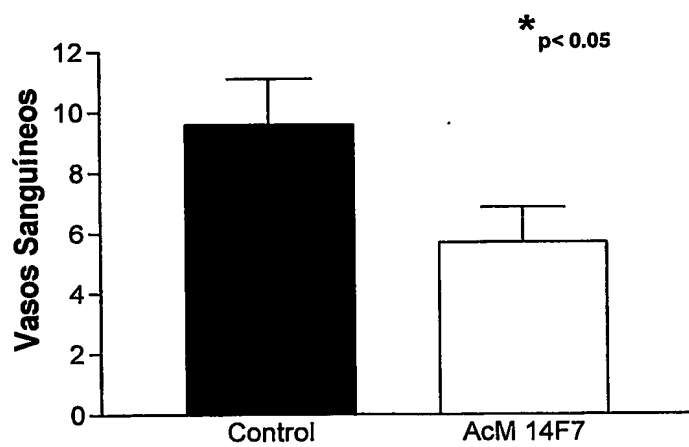
25

FIGURA 4:

A )



15 B)



20

25

FIGURA 5:

5

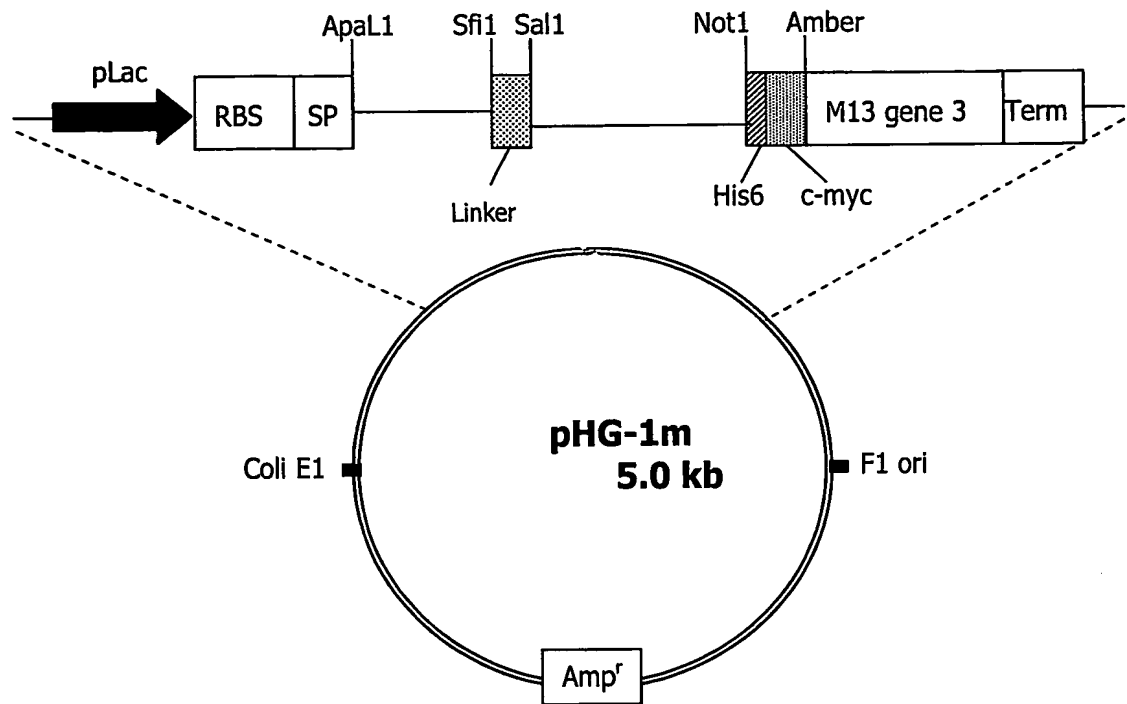


FIGURA 6:

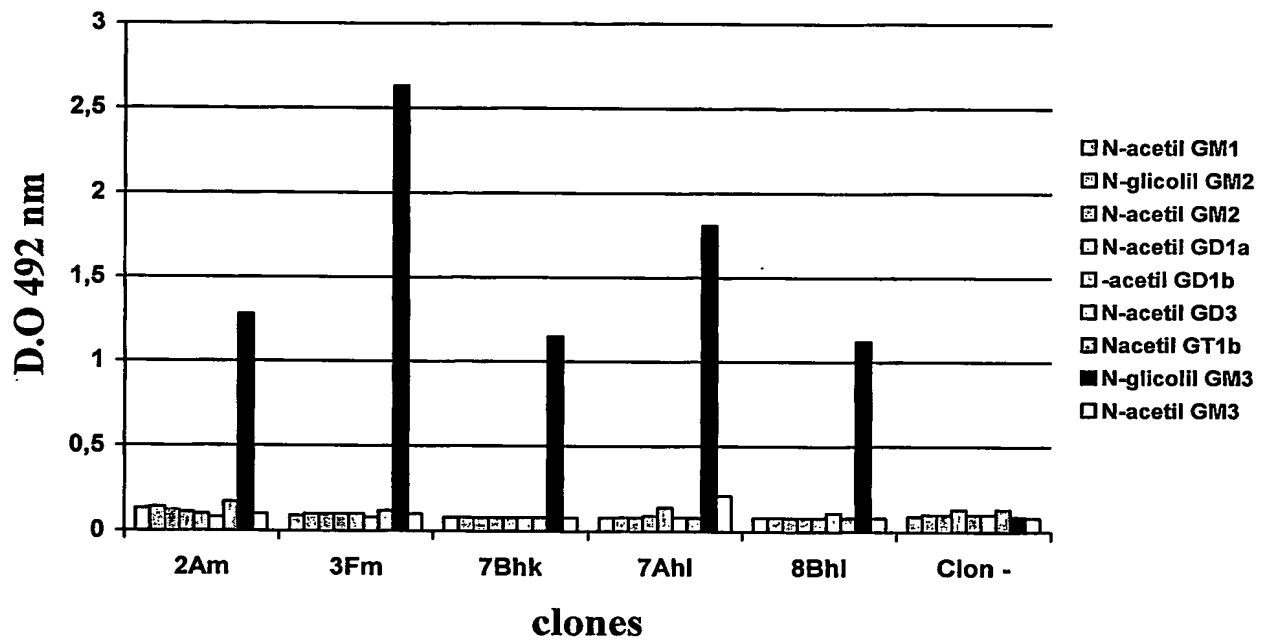
	fr1	CDR1
14F7 Mab	D L V L T Q S P A T L S V T P G D S V S F S C	R A S Q S V S S S I S N N L H
2Am scFv	. I . M F . . . S . A . S L . Q R A T I . .	. . . . S V S S . S Y S Y M . N
3Fm scFv	. I Q M . . T . S S . . A S L . . R . T I . .	. . . . . D . . . S Y . N
7Bhk scFv	. I Q M . . T . S S . . A S V . . R . T I . .	. T G T S S D V . . . S F . N
7Ah1 scFv	Q S V V . . P . S A . G G . . Q . L T I . .	Q G D S L R . Y Y A S
8B h1 scFv	S S E L . . D . . V . . A L . . Q T . R I T .	

	fr2	CDR2	fr3
W Y Q Q R T H E S P R L L I K	Y A S Q S I S	G I P S R F S G S G S G T D F	
. . . . K P G Q P . K . . . V	. . . N L E .	. V . A . . . . . . . . . Y	
. . . . K P D G T V K . . . Y	. T . R L L H .	. V . . . . . . . . . . Y	
. . . . K P G K A . K . . . Y	A . . N L Q .	. V . . . . . R . . . . . A	
. . . . H P G K A . K . M . Y	D V . K R P .	. V . H . . . . . K . . . . . A	
. . . . K P G Q A . V . V . Y	G K N N R P .	. . . D . . . . . S . . . . . A	

	fr3	CDR3	fr4
T L S I I A V E T E D F G M Y F C	Q Q S N R W P	L T F	G A G T K L E L K
. . N . H P . . E . . A A T . Y .	. H . R D V .	. . . . .	. . . . . I .
S . T . S N L . Q . . I A T . . .	. . G . T T L .	P . . . .	. . . . . .
. . T . S S L Q P . . A A . Y .	. . G Y T T .	. . . . .	. . . . . .
S . T V S S G L Q A . . E A V . Y .	S S Y A G S S N	. V . . .	. . . . . V L
S . T . T G A Q A . . E A D . Y .	N S R D S S G N	H V V .	. . . . . T V L

FIGURA 7:

5



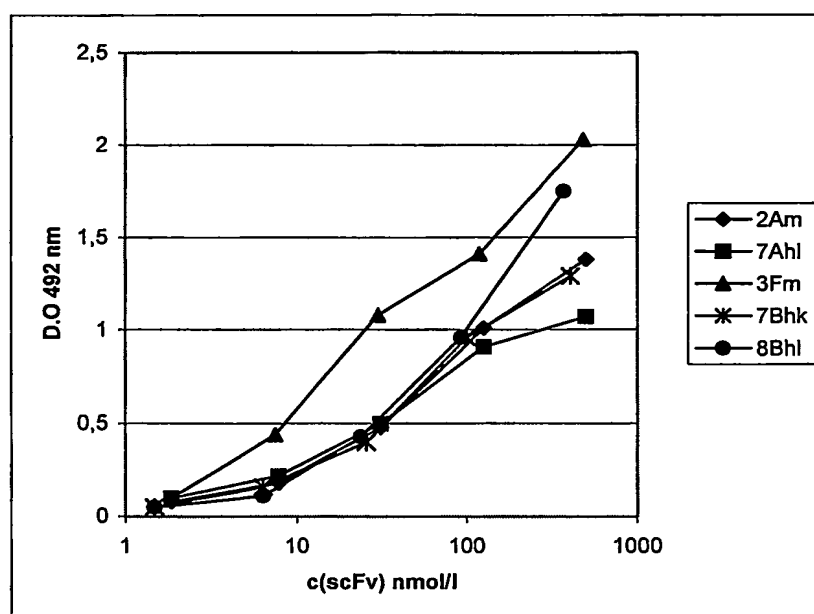
10

15

20

FIGURA 8.

5



10

15



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**